

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Patentschrift
10 DE 199 12 798 C 1

51 Int. Cl.⁷:
C 12 N 5/08
C 12 M 3/04

21 Aktenzeichen: 199 12 798.0-41
22 Anmeldetag: 10. 3. 1999
43 Offenlegungstag: -
45 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 17. 2. 2000

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:
Jordan, Andreas, Dr.rer.nat., 14167 Berlin, DE

74 Vertreter:
Wablat, W., Dipl.-Chem. Dr.-Ing. Dr.jur., Pat.-Anw.,
14129 Berlin

72 Erfinder:
gleich Patentinhaber

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
CA 120:320383;

54 Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewebe und Vorrichtung zur Aufbereitung von Gewebeproben

57 Bei einem Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen für naturwissenschaftliche Reihenuntersuchungen wird eine in bezug auf Kontaminanten, Normalzellen und Tumorzellen heterogene Gewebeprobe in einem sequenziell-parallelen Schneidvorgang örtlich aufgelöst. Die orts aufgelösten Probensegmente werden weiter geteilt, wobei die Gewebefragmente und -flüssigkeiten der Gewebeselemente separat in einem bestimmten Zellkulturmedium unter vorgegebenen Kulturbedingungen zum Wachstum gebracht werden. Es werden ein Zellkulturmedium sowie eine Vorrichtung zum Teilen der Gewebeprobe in Scheibensegmente angegeben. Mit dem Verfahren wird in Verbindung mit der Schneidvorrichtung und dem Kulturmedium bei allen Tumorarten eine schnelle Kultivierung von aus Humangewebe gewonnenen Krebszellen mit einer Angehrate von 100% erreicht.

DE 199 12 798 C 1

DE 199 12 798 C 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewebe für naturwissenschaftliche, vorzugsweise molekularbiologische und zellbiologische Reihenuntersuchungen sowie ein Zellkulturmedium zur Durchführung des Verfahrens und eine Vorrichtung zur Aufarbeitung der Gewebeproben.

Für molekularbiologische Untersuchungen, vor allem mit prädiagnostischer Intention, ist die Kultur von primären, aus Feinnadel- und Stanzbiopsien gewonnenem Zellmaterial von zentraler Bedeutung. Bei den bekannten Methoden ist jedoch die "Angeheer" der aus Humangewebe isolierten Zellen sehr gering. Bei manchen Tumorarten ist eine Zellkultivierung bisher nicht gelungen. Diese Problematik ist zum einen dadurch begründet, daß die das Tumorgewebe umgebenden Normalzellen und/oder die das Tumorgewebe infiltrierenden Bindegewebszellen als erste wachsen und so die Tumorzellen, die für die Untersuchungen gewonnen werden sollen, überwachsen und am Wachstum hindern. Eine erfolgreiche Kultivierung von Krebszellen wird darüber hinaus durch vielfältige Kontaminationen, insbesondere mit Bakterien oder Pilzen, verhindert.

Die bisher für die Kultivierung von Tumorzellen verwendeten Zellkulturmedien, wie RPMI 1640, Basal Medium Eagle, ISCOVE's, Medium 199, Leibovitz L-15, u. a., sind nicht in der Lage, das Wachstum der Krebszellen in ausreichendem Maße zu fördern bzw. das der Normalzellen und bakteriellen Kontaminanten zu verhindern. Der bisher übliche unkontrollierte Einsatz von Antibiotika wirkt zwar den negativen Einflüssen der Kontaminanten entgegen, behindert aber gleichzeitig das Wachstum der Tumorzellen.

Bei den bekannten Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen erfolgt die Aufbereitung der aus Feinnadel- oder Stanzbiopsien gewonnenen Gewebeproben durch eine mechanisch-enzymatische Gewebe-Disaggregation, bei der der heterogene, aus verschiedenen Schichten bestehende, die Gewebeprobe bildende Stanzzyylinder durch eine Feinzerkleinerung als Ganzes in eine breiige Masse zerteilt und mit Hilfe von Enzymen in einzelne Zellen umgewandelt werden soll. Durch diese Feinzerkleinerung wird aber die heterogene Struktur der entnommenen Gewebeprobe zerstört und es erfolgt eine intensive Vermischung der Tumorzellen mit den Normalzellen und Kontaminanten. Zum einen wird die Vitalität der Tumorzellen durch die Feinzerkleinerung beeinträchtigt. Andererseits ist durch die Zerstörung der Heterogenität der Gewebeprobe der Probematerialbrei mit Normalzellen und Kontaminanten durchsetzt, so daß das Wachstum der Tumorzellen aus den oben genannten Gründen vermindert oder sogar vollständig verhindert wird. Bei dieser Art der mechanisch-enzymatischen Gewebe-Desaggregation des Gesamtmaterials sind Aussagen über die Struktur des Tumors nicht möglich.

Bei den bisher bekannten Verfahren zur Vermehrung und Reinigung des aus einer Gewebeprobe gewonnenen Tumormaterials wird die Zellvermehrung durch Transplantation des Tumormaterials auf eine Nacktmaus vorgenommen (Xenotransplantat). Bei diesem Verfahren können zwar Angeheeraten des transplantierten Tumorgewebes von 50% und gelegentlich auch mehr erreicht werden, jedoch vergehen – je nach Tumorart und Eigenschaften – mehrere Wochen oder gar Monate, ehe sich eine Zellvermehrung in vivo einstellt. Aufgrund des erheblichen Aufwands und der Zeitdauer haben Routinetests mit patientenindividuellen Primärzellen für eine Verlaufskontrolle und prädiagnostische Zwecke bisher nicht Eingang in die klinische Anwendung gefunden. Aufgrund der langwierigen und oftmals vergeblichen Versuche zur Kultivierung des vom Patienten entnommenen Gewebematerials liegen die Testergebnisse viel zu spät vor, um in einem Routineverfahren aus den Versuchsergebnisse eine rechtzeitige Änderung des Therapieregimes vornehmen zu können. Neben dem hohen Zeitaufwand ist auch die erforderliche Durchführung von Tierversuchen und der hohe Kostenaufwand nachteilig.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein von Tierversuchen unabhängiges Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewebeproben anzugeben, das in einem vergleichsweise kurzen Zeitraum von wenigen Tagen eine sichere Vermehrung von Tumorzellen aus einer Gewebeprobe gewährleistet und reproduzierbare Aussagen über die Struktur und die Malignität des Tumors sowie Wachstums- und Strukturänderungen oder therapeutische Effekte zuläßt. Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht in der Bereitstellung einer auf dem Verfahren beruhenden Vorrichtung zur reproduzierbaren Aufbereitung von Gewebeproben sowie einem geeigneten Zellkulturmedium zur Vermehrung von Krebszellen in vitro.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe mit einem Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen gemäß den Merkmalen des Patentanspruchs 1 gelöst.

Der Grundgedanke der Erfindung besteht dabei darin, daß die Gewebeprobe in einem sequentiell-parallelen Schneidvorgang in eine Mehrzahl separater Gewebeselemente aufgeteilt wird und somit die auf der Grundlage von Kontaminanten, Normalzellen und Tumorzellen heterogene Gewebeprobe bzw. deren Heterogenität örtlich aufgelöst wird. Die Gewebeselemente werden dann jeweils separat weiter zerkleinert und die so gebildeten kleinen, separierten Gewebefragmente und -flüssigkeiten sowie die bei der sequentiell-parallelen Teilung der Gewebeprobe entstandene, ebenfalls jeweils separat gewonnene Gewebeflüssigkeit werden in einem spezifischen Zellkulturmedium und unter ausgewählten Kulturbedingungen kultiviert. Durch die örtliche Auflösung der Gewebeprobe werden die Einflüsse von in dieser vorhandenen Normalzellen, die bei üblicher – mechanischer oder enzymatischer – Aufbereitung der Gewebeprobe ein Überwachsen der Tumorzellen bewirken, ausgeschaltet oder zurückgedrängt. Gleichmaßen wird das Ausmaß von Kontaminationen, wie Pilze oder Bakterien, wesentlich reduziert bzw. erforderliche Antibiotika, die die Vermehrung von Tumorzellen bekanntermaßen stören, können sparsam und gezielt eingesetzt werden, ohne sich auf die Krebszellenkultivierung negativ auszuwirken.

Das vorgeschlagene Verfahren wird in weiterer Ausbildung der Erfindung durch ein für sehr geringe Gewebemengen geeignetes Zellkulturmedium in der im Anspruch 8 wiedergegebenen Zusammensetzung sowie durch die im Anspruch 5 hinsichtlich der Sauerstoff- und Kohlendioxidatmosphäre, der Luftfeuchte und der Temperatur sowie der Verwendung einer Biomatrix dargelegten Kultivierungsbedingungen vorteilhaft ergänzt. Insgesamt werden somit Bedingungen geschaffen, unter denen das Wachstum der Krebszellen gefördert und das der Normalzellen und Kontaminanten wesentlich eingeschränkt oder sogar vollständig ausgeschaltet wird.

Weitere vorteilhafte Verfahrensmerkmale ergeben sich aus den Unteransprüchen. So wurde beispielsweise gefunden,

daß die Tumorzellen in Anwesenheit von Erythrozyten, die unmittelbar von der Entnahmestelle der Gewebeprobe am Patienten stammen, besonders schnell wachsen und eine höhere "Angehrate" besitzen als Zellen, die nur im reinem Zellkulturmedium zum Wachstum gebracht werden. Darüber hinaus hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn die Gewebeprobe mindestens 2 Stunden, aber nicht länger als 24 Stunden, bei etwa 4°C bis 12°C in einem Zellkulturmedium aufbewahrt wird, um bereits jetzt an das Zellkulturmedium, in dem später die Vermehrung der Krebszellen erfolgen soll, angepaßt zu werden. Unter den aufgeführten Verfahrensbedingungen ist eine Adhäsion der Tumorzellen aus den aufbereiteten Gewebefragmenten an einer Biomatrix in der Zellkulturflasche bereits nach 1 bis 12 Stunden zu verzeichnen, sofern eine dem Gewebeentnahmeart identische Kulturtemperatur eingestellt wird.

Mit der vorliegenden und weiter unten in einem Ausführungsbeispiel detailliert beschriebenen Erfindung wird somit ein Verfahren zur Vermehrung von Tumorzellen in vitro angegeben, mit dem in einem vergleichsweise kurzen Zeitraum bei allen Tumorarten eine Kultivierung von aus Ilumangewebe gewonnenen Zellen mit einer "Angehrate" von 100% gelingt. Gegenüber der auf der Nacktmaus (Xeno-Transplantat) erzielten Zellvermehrung, bei der Angehraten von etwa 50% erzielt werden, werden nicht nur Tierversuche vermieden und Kosten gespart, sondern es ist auch eine drastische Verkürzung der für die Vermehrung des Zellmaterials benötigten Zeit zu verzeichnen, die gegenüber einem Zeitraum von mehreren Wochen oder gar Monaten beim Tumorwachstum in vivo bei dem erfindungsgemäß vorgeschlagenen Verfahren in der Regel bei lediglich 1-10 Tagen liegt.

Dadurch ist es erstmals möglich, Routineuntersuchungen für die Verlaufskontrolle von Krebserkrankungen und für prädiagnostische Zwecke (Sensibilitätestest mit Strahlen, Chemotherapie, Hyperthermie) oder zur Früherkennung von Resistenzen zur Identifikation neuer Antikrebswirkstoffe, als Ergänzung für zytologische oder histopathologische Gewebefunde und in der Grundlagenforschung auf einfache und reproduzierbare Weise schnell und kostengünstig durchzuführen.

Nach einem weiteren Merkmal der Erfindung ist zur erfindungsgemäß orts aufgelösten Aufbereitung der Gewebeprobe als entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Zellvermehrung eine Vorrichtung gemäß den Merkmalen des Anspruchs 9 vorgesehen. Diese Vorrichtung besteht zum einen aus einem Schneidapparat zum sequentiell-parallelen Teilen der Gewebeprobe und zum anderen aus einem Zerkleinerungsgerät zur weiteren Aufarbeitung der mit dem Schneidapparat hergestellten Gewebeselemente. Bei den in diesen Vorrichtungen durchgeführten Schneidvorgängen werden die jeweiligen Gewebestücke und -flüssigkeiten, die von verschiedenen Stellen der heterogenen Gewebeprobe stammen, voneinander getrennt in der Vorrichtung gehalten und können somit selektiv für die Zellvermehrung eingesetzt werden.

Der Schneidapparat umfaßt im wesentlichen eine in Kammern eingeteilte Auffangschale mit einer auf dieser beweglich angebrachten Schneidplatte sowie einen Schneidmesserrahmen. In der Schneidplatte in vorgegebenen Abständen ausgebildete Schneidrinnen, die im Schneidbereich zur Auffangschale hin offen sind, liegen jeweils oberhalb einer Kammer. Im Schneidmesserrahmen sind Schneidmesser oder Schneiddrähte in einem Abstand angebracht, der mit dem zwischen den Schneidrinnen übereinstimmt. Durch das Schneiden der auf der Schneidplatte liegenden Gewebeprobe jeweils im Bereich einer Schneidrinne wird ein sauberes Abtrennen der Gewebeselemente erreicht, und gleichzeitig gelangen Reststücke und Gewebeflüssigkeit in die unterhalb der Schneidrinne liegende Kammer.

Zur weiteren Aufbereitung der Gewebeselemente ist ein Zerkleinerungsgerät vorgesehen, das aus einer in Kammern geteilten Flüssigkeits-Auffangschale, einer auf dieser lösbar angebrachten Aufbereitungsplatte mit Vertiefungen zur Aufnahme der Gewebeselemente und einzelnen oder in einer Halteplatte drehbar und längsbeweglich angeordneten Drehstempeln mit an deren Stirnseite befestigten Messern besteht. Mit diesem Gerät werden die zur Zellvermehrung letztlich eingesetzten kleinen Gewebefragmente erzeugt. Die gleichfalls verwendbare, bei dem Schneidvorgang entstehende Gewebeflüssigkeit gelangt über in den Vertiefungen ausgebildete Löcher in die jeweils darunterliegende Kammer in der Flüssigkeits-Auffangschale und wird ebenfalls zur Zellvermehrung verwendet.

Weitere Merkmale und vorteilhafte Weiterbildungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung ergeben sich aus den übrigen Unteransprüchen.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung wird nachfolgend beschrieben, wobei hinsichtlich der Zellvermehrung in vitro auf die beigefügte Tabelle, in der die Zusammensetzung des verwendeten Zellkulturmediums wiedergegeben ist, und hinsichtlich der Aufarbeitung der Gewebeproben auf die beigefügte Zeichnung Bezug genommen wird. In der Zeichnung zeigen:

Fig. 1 eine auseinandergezogene perspektivische Ansicht einer Schneidvorrichtung zur erfindungsgemäßen sequentiell-parallelen Aufbereitung einer Gewebeprobe;

Fig. 2 eine auseinandergezogene perspektivische Darstellung einer Vorrichtung zur weiteren Aufbereitung der in der Vorrichtung nach **Fig. 1** hergestellten Gewebeselemente für die Zellvermehrung in vitro;

Fig. 3 eine Schnittansicht einer Auffangschale längs der Linie B-B in **Fig. 1**;

Fig. 4 einen senkrechten Schnitt durch eine Schneidplatte im Bereich einer Schneidrinne längs der Linie A-A in **Fig. 1**; und

Fig. 5 eine Querschnittsansicht der Vorrichtung nach **Fig. 2** in zusammengebautem Zustand.

Die vom Patienten in Form einer Feinnadel- bzw. Stanz-Biopsie entnommene Gewebeprobe liegt als Gewebestanzzyylinder vor, kann aber auch ein nach anderen Verfahren gewonnenes kleines Gewebefragment oder ein Gewebestück unterschiedlicher Form und Größe sein. Die Gewebeprobe mit den an dieser haftenden, von der Entnahmestelle der Probe am Patienten stammenden Erythrozyten wird für den Transport zum Untersuchungsort in einem Zellkulturmedium bei Temperaturen zwischen 2°C und 12°C aufbewahrt, und zwar für einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden, maximal jedoch 24 Stunden. In diesem Zeitraum werden mechanische Belastungen des Gewebestücks vermieden. Das Gewebestück kann sich dabei bereits an das auch zur Zellvermehrung später benutzte Zellkulturmedium mit gleicher Zusammensetzung anpassen, wobei die oben angegebenen Temperaturen besonders günstig sind.

Die Aufarbeitung der Gewebeprobe für die Zellkultivierung erfolgt mit den in der Zeichnung dargestellten Vorrichtungen.

Die Vorrichtung zum sequentiell-parallelen Teilen der Gewebeprobe in Abschnitte von bestimmter, vorgegebener Länge und zum Separieren dieser Abschnitte bzw. von Bestandteilen derselben umfaßt eine Auffangschale 1, eine auf der

Auffangschale 1 gehaltene Schneidplatte 2 und einen Schneidmesserrahmen 3. Die Schneidplatte 2 ist in fünf Abschnitte gleicher Breite eingeteilt. In jedem Abschnitt befinden sich jeweils in unterschiedlichem Abstand angeordnete Schneidrinne 4, die in ihrem mittleren Bereich zur Auffangschale 1 hin offen sind. Die Schneidrinne 4 sind in den fünf Abschnitten jeweils im Abstand von 1 mm, 2 mm, 3 mm, 5 mm und 1 mm angeordnet. In Längsrichtung der Schneidplatte ist in deren mittlerem Bereich eine aufgerauhte Auflagefläche 5 ausgebildet, um die darauf liegende Gewebeprobe 6 bei einem Schneidvorgang zu fixieren. In diesem Bereich sind die Schneidrinne 4 nach unten offen. Die Schneidplatte 2 ist in zwei an den Längsseiten der Auffangschale 1 angebrachten Führungsschienen 7 verschiebbar gehalten. Die Schneidrinne 4 in der Schneidplatte 2 setzen sich in Einschnitten 8 in den Führungsschienen fort.

Die Auffangschale 1 ist entsprechend den in der Schneidplatte 2 vorgesehenen Rinnenabschnitten durch Trennwände 12 in fünf Kammern 1a–1e geteilt, wobei den Schneidrinne durch weitere Zwischenwände in den betreffenden Kammern 1a, 1b, 1c und 1e jeweils Unterkammern 1a1 bis 1a9, 1b1 bis 1b4, 1c1 bis 1c3 und 1e1 bis 1e9 zugeordnet sind. Die Unterkammern sind zur exakten örtlichen Zuordnung der einzelnen Gewebeprobensegmente 6a oder Gewebeprobe Reste bzw. Gewebeflüssigkeit entsprechend unterschiedlich markiert.

Der Schneidmesserrahmen 3 besteht aus einem Deckel oder Halterahmen mit an dessen Deckplatte befestigten Schneidmessern 10. Anstelle der Schneidmesser 10 können zwischen den Rahmenseiten auch Schneiddrähte gespannt sein. Die Schneidmesser 10 sind im gleichen Abstand wie die Schneidrinne 4 in der Schneidplatte angeordnet. Der Schneidmesserrahmen 3 ist so dimensioniert bzw. die Schneidmesser 10 sind so angeordnet, daß die Schneidelemente über bzw. in den Schneidrinne 4 und Einschnitten 8 hin- und herbewegt werden können. Der Schneidmesserrahmen 3 kann an einer Längsseite der Auffangschale 1 gelenkig befestigt sein, und zwar so, daß er in der auf der Schneidplatte 2 befindlichen Lage dennoch quer zur Gewebeprobe bewegt werden kann, um die Probe an den Schnittstellen sauber zu durchtrennen.

In Abhängigkeit von der Länge der Gewebeprobe und dem gewünschten Schnittabstand wird die Gewebeprobe 6 auf die aufgerauhte Auflage 5 der Schneidplatte 2 gelegt. Durch Hin- und Herbewegen des auf die Gewebeprobe gelegten (geklappten) Schneidmesserrahmens 3 wird das Präparat im Bereich der Schneidrinne 4 durchtrennt. Beim Schneiden entstehende Flüssigkeit fließt über die im Bereich der Auflagefläche 5 der Schneidplatte 2 in den Schneidrinne 4 vorgesehenen Öffnungen 4a in die jeweils darunter liegende Unterkammer. Die aufgefangene Flüssigkeit kann ebenso für die Zellvermehrung genutzt werden wie die abgetrennten Probensegmente, die entweder auf der Schneidplatte 2 liegenbleiben oder durch die Öffnung 4a in der Schneidrinne 4 in die darunterliegende Unterkammer fallen.

Mit der beschriebenen Vorrichtung gemäß den Fig. 1, 3 und 4 können in den vorgegebenen Abmessungen präzise und gleichmäßige sowie glatte Schnitte ohne Beschädigung des Probenmaterials reproduzierbar ausgeführt werden. Die Zellvermehrung erfolgt somit aus einer entsprechend der Heterogenität des dem Patienten entnommenen Gewebestücks durch die Segmentierung örtlich aufgelösten Gewebeprobe. Dadurch wird der störende Einfluß von Normalzellen und Kontaminanten auf das Wachstum der Tumorzellen zurückgedrängt bzw. ausgeschaltet (Selektion). Außerdem kann auch die beim Schneiden der Gewebeprobe ortsaufgelöst entstehende Gewebeflüssigkeit, die wichtige Stammzellen enthält, für die Zellvermehrung genutzt werden. Im Ergebnis der sich an die unten beschriebene weitere Aufbereitung der Gewebeprobe anschließenden Zellvermehrung in vitro können Aussagen über die Struktur der heterogen ausgebildeten Gewebeprobe, über die Anordnung des Tumorkerns oder die Malignität getroffen werden. Schließlich ist die Herstellung der Probensegmente mit der jeweiligen Ortsauflösung auch reproduzierbar, so daß verlässliche Aussagen über den Verlauf der Erkrankung oder die Wirkung therapeutischer Maßnahmen getroffen werden können.

In einer Ausführungsvariante der oben beschriebenen Schneidvorrichtung kann das Durchtrennen der Gewebeprobe auch mit einem separaten Messerstempel (nicht dargestellt) erfolgen, an dem die Schneidmesser oder Schneiddrähte in einem Abstand angebracht sind, der mit dem zwischen den Schneidrinne 4 übereinstimmt.

In den Fig. 2 und 5 ist eine Vorrichtung zur weiteren Aufbereitung der ortsaufgelöst zur Verfügung gestellten Probensegmente 6a oder von Reststücken wiedergegeben. Bei dieser Vorrichtung ist eine Flüssigkeits-Auffangschale 13 durch senkrechte Trennwände 11 in mehrere Kammern 13a bis 13e aufgeteilt. In zwei am oberen Rand der Flüssigkeits-Auffangschale 13 gegenüberliegend angebrachten Führungsschienen 14 ist eine Aufbereitungsplatte 15 mit in dieser im Abstand eingeformten Vertiefungen 16 gehalten. Die Vertiefungen 16 weisen am Boden kleine Löcher 17 auf. In der in die Führungsschienen 14 vollständig eingeschobenen Lage der Aufbereitungsplatte 15 liegen die Vertiefungen 16 jeweils über einer Kammer 13a bis 13e. Die zuvor abgetrennten Probensegmente 6a der Gewebeprobe 6 werden in die Vertiefungen 16 gelegt und mit einem Drehstempel 18 befestigten Drehstempelmesser 19 weiter zerkleinert. Vorzugsweise sind 2 oder mehrere Drehstempelmesser 19 an der Stirnseite des Drehstempels angeordnet. Das Zerkleinern der Probensegmente 6a erfolgt bei leichtem Druck und gegebenenfalls gleichzeitigem Hin- und Herdrehen des Drehstempels 18.

Wie Fig. 2 zeigt, können auch mehrere Drehstempel 18 in einer Halteplatte 20 drehbeweglich und heb- und senkbar gehalten sein. Der Abstand zwischen den Drehstempeln 18 entspricht dem der Vertiefungen 16 in der Aufbereitungsplatte 15.

Nach der weiteren Teilung der Probensegmente 6a stehen deren Teilstücke (Gewebefragmente) und die bei diesem Trennvorgang entstehende Gewebeflüssigkeit, die über die Löcher 17 in den Vertiefungen 16 in die Kammern 13a bis 13e gelangt, für die Zellvermehrung zur Verfügung.

Die in den Fig. 1 bis 5 dargestellten Vorrichtungen zum ortsaufgelösten, sequentiell-parallelen Schneiden und weiteren Aufbereiten der Gewebeprobe bestehen aus einem bis 121°C beständigen, zur Behandlung im Autoklav geeigneten Material, vorzugsweise Teflon, Metall oder Plastik. Für die Schneidmesser wird vorzugsweise Glas verwendet.

Die einzelnen Teilstücke und die jeweilige Gewebeflüssigkeit der ortsaufgelöst hergestellten Probensegmente 6a werden nun separat in einzelne, mit dem gleichen Zellkulturmedium, in dem sich bereits die dem Patienten entnommene Gewebeprobe 6 befand, gefüllte Zellkulturflaschen eingebracht. Das verbleibende Zellkulturmedium, in dem die Gewebeprobe nach der Probenahme aufbewahrt wurde, wird ebenfalls in eine Zellkulturflasche gefüllt. Die Zellkulturflaschen sind jeweils mit einer Biomatrix, hier Collagen oder Polylysin beschichtet. Die Zusammensetzung des hier für die Zellvermehrung in vitro eingesetzten Zellkulturmediums ist in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben:

DE 199 12 798 C 1

Anorganische Salze

Ca(NO ₃) ₂	50 mg/L	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	132 mg/L	
KCl	400 mg/L	5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	150 mg/L	
NaCl	400 mg/L	
NaHCO ₃	2100 mg/L	
Na ₂ HPO ₄	400 mg/L	10

Aminosäuren

L-Arginin · 4HCl	110 mg/L	
L-Asparagin (freie Base)	38 mg/L	15
L-Asparaginsäure	23 mg/L	
L-Cystin	31 mg/L	
L-Glutaminsäure	25 mg/L	
L-Glutamin	296 mg/L	
Glycin	13 mg/L	20
L-Histidin (freie Base)	12 mg/L	
L-Hydroxyprolin	10 mg/L	
L-Isoleucin	38 mg/L	
L-Leucin	38 mg/L	
L-Lysin · HCl	35 mg/L	25
L-Methionin	12 mg/L	
L-Phenylalanin	16 mg/L	
L-Prolin	22 mg/L	
L-Serin	26 mg/L	
L-Threonin	22 mg/L	30
L-Tryptophan	5 mg/L	
L-Tyrosin	19 mg/L	
L-Valin	22 mg/L	
L-Alanin	10 mg/L	35

Vitamine

Biotin	0,6 mg/L	
D-Ca-Pantothenat	0,7 mg/L	40
Cholinchlorid	3,5 mg/L	
Folsäure	1,0 mg/L	
i-Inositol	35,9 mg/L	
Nicotinamid	1,0 mg/L	
Pyridoxal · HCl	1,0 mg/L	45
Riboflavin	20 µg/L	
Thiamin · HCl	1,0 mg/L	
Para-Aminobenzoessäure	500 µg/L	
Vitamin B ₁₂	5 µg/L	50
Niacin	25 µg/L	
Ascorbinsäure	50 µg/L	
Folinsäure	6 µg/L	
Liponsäure	21 µg/L	
Vitamin A (Acetat)	100 µg/L	
Pyridoxin · HCl	25 µg/L	55
Niacinamid	25 µg/L	
α-Tocopherolphosphat	10 µg/L	

Weitere Komponenten

D-Glucose	1750 mg/L	
Phenolrot	7 mg/L	
Glutathion (reduziert)	0,5 mg/L	
Na-Pyrovat	1 mM	65
Epidermal Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor, EGF-rekombinant)	250 ng/L	

Fötales Rinderserum (FBS)
Insulin vom Rind (Lyophilisat)

12,5%
8 mg/L (26 U/mg)

Antibiotika nach Stand der Technik.

- 5 Die mit einer Biomatrix beschichteten Zellkulturflaschen mit dem erfindungsgemäßen Zellkulturmedium und den in diesem befindlichen, nach dem zuvor beschriebenen Aufbereitungsverfahren hergestellten kleinen Gewebefragmenten bzw. der Gewebeflüssigkeit werden anschließend in einen Brutschrank eingebracht und dort bei einer Temperatur zwischen 30°C und 36,5°C, einer Sauerstoffatmosphäre von 0,01 bis 3%, einer Kohlendioxidatmosphäre von 0,1 bis 5% und einer Luftfeuchte von 100% aufbewahrt. Die genaue Temperatur richtet sich nach der Temperatur, die bei der Entnahme
10 der Gewebeprobe gemessen wurde.

- Bereits nach 1 bis 12 Stunden erfolgt eine Adhäsion der Tumorzellen an das Biomatrixsubstrat in der Zellkulturflasche. Etwa 24 Stunden nach der Erstetablierung der Kultur wird nach erfolgter Zelladhäsion das in den Zellkulturflaschen befindliche Medium gegen ein frisches Zellkulturmedium, das die gleiche Zusammensetzung wie das erste aufweist, ausgetauscht. Weitere Medienwechsel werden – je nach Präsenz von Kontaminanten – in der ersten Woche durchgeführt. Nachdem die Tumorzellen nach einer Ruhephase etabliert sind und sich vermehren, werden sie in einem von
15 Antibiotika freien Medium gehalten. Daraufhin wird die Massenvermehrung initiiert.

- Durch die oben beschriebene frühzeitige Teilung der Gewebeprobe nach 2 bis 24 Stunden in separate Gewebesegmente bzw. noch kleinere Gewebefragmente ist die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination und einer Massenvermehrung von Kontaminanten in den Kulturflaschen gering. Dennoch vereinzelt aufgefundene Kulturflaschen mit hoher Kontaminationsbelastung werden verworfen. Bei einer durch technische Fehler bedingten starken Vermehrung von Normalzellen, die zu einem Überwachsen der Tumorzellen führen, kann auch eine Magnetseparation durchgeführt werden, woraufhin unter den oben angegebenen Kulturbedingungen ein selektives Wachstum der malignen Zellen gewährleistet ist.
20

Bezugszeichenliste

- 25
1 Auffangschale
1a1 bis 1a10 Unterkammern
1b1 bis 1b5 Unterkammern
1c1 bis 1c3 Unterkammern
30 1d
1e1 bis 1e10 Unterkammern
2 Schneidplatte
3 Schneidmesserrahmen
4 Schneidrinnen
35 4a Öffnung in 4
5 Auflagefläche
6 Gewebeprobe
6a Probensegment
7 Führungsschiene
40 8 Einschnitte
10 Schneidmesser/Schneiddrähte
11 Trennwand
12 Trennwand
13 Flüssigkeitsauffangschale
45 13a bis 13e Kammern
14 Führungsschienen
15 Aufbereitungsplatte
16 Vertiefungen
17 Löcher
50 18 Drehstempel
19 Drehstempelmesser
20 Drehstempel-Halteplatte

Patentansprüche

- 55 1. Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewebe für molekularbiologische Reihenuntersuchungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine Gewebeprobe (6) auf der Grundlage ihrer heterogenen Struktur in bezug auf Tumorzellen, Normalzellen und Kontaminanten durch eine sequentiell-parallele Teilung in Scheibensegmente örtlich aufgelöst wird und die einzelnen Gewebeprobensegmente separiert und weiter in Gewebefragmente geteilt
60 werden und die gewonnenen kleinen, separierten Gewebefragmente und Gewebeflüssigkeiten der ortsaufgelösten Gewebeprobensegmente (6a) in einem bestimmten Zellkulturmedium unter vorgegebenen Kulturbedingungen selektiv zum Wachstum gebracht werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeprobe aus Feinnadel-, Aspirations- und intraoperativem Biopsien oder einer Resektatprobe gewonnen wird und zusammen mit den an der Gewebeprobe haftenden Erythrozyten aus dem Bereich der Entnahmestelle der Probe an dem betreffenden Patienten vorübergehend
65 in ein Zellkulturmedium eingebracht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturmedium zur zwischenzeitlichen Aufbewahrung der frischen Gewebeprobe mit dem Vermehrung der Tumorzellen vorgesehenen Zellkulturmedium iden-

tisch ist.

4. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeprobe (6) zur Anpassung an das Zellkulturmedium in diesem mindestens 2 Stunden, jedoch nicht länger als 24 Stunden bei einer Temperatur zwischen 4°C und 12°C verbleibt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die aus den ortsaufgelösten Gewebeprobensegmenten (6a) erzeugten Gewebefragmente und -flüssigkeiten separat in mit einer Biomatrix beschichteten und mit dem Zellkulturmedium gefüllten Zellkulturflaschen unter einer Sauerstoffatmosphäre von 0,01 bis 3% und einer Kohlendioxidatmosphäre von 0,1–5% sowie bei einer Luftfeuchte von 100% und Temperaturen zwischen 30°C und 36,5°C kultiviert werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine bestimmte Zeit nach der Erstetablierung der Kultur und erfolgter Zelladhäsion das Zellkulturmedium in der Kulturflasche gegen ein neues, jedoch mit gleicher Zusammensetzung ausgetauscht wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturmedium in Abhängigkeit von der Präsenz von Kontaminanten, insbesondere Bakterien oder Pilze, bei gleichbleibendem oder verringertem Anteil an Antibiotika ausgetauscht wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturmedium aus anorganischen Salzen, nämlich

Ca(NO ₃) ₂	210–100 mg/L	20
CaCl ₂ · 2H ₂ O	80–150 mg/L	
Kcl	200–1000 mg/L	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	200–700 mg/L	
NaCl	3000–10000 mg/L	
NaHCO ₃	1500–4000 mg/L	25
Na ₂ HPO ₄	100–1000 mg/L;	

Aminosäuren, nämlich

L-Arginin · 4HCL	10–500 mg/L	
L-Asparagin (freie Base)	10–500 mg/L	
L-Asparaginsäure	10–500 mg/L	
L-Cystin	10–500 mg/L	35
L-Glutaminsäure	10–500 mg/L	
L-Glutamin	10–500 mg/L	
Glycin	10–500 mg/L	
L-Histidin (freie Base)	10–500 mg/L	
L-Hydroxyprolin	10–500 mg/L	40
L-Isoleucin	10–500 mg/L	
L-Leucin	10–500 mg/L	
L-Lysin · HCL	10–500 mg/L	
L-Methionin	10–500 mg/L	
L-Phenylalanin	10–500 mg/L	45
L-Prolin	10–500 mg/L	
L-Serin	10–500 mg/L	
L-Threonin	10–500 mg/L	
L-Tryptophan	10–400 mg/L	
L-Tyrosin	10–500 mg/L	50
L-Valin	10–500 mg/L	
L-Alanin	10–300 mg/L	

Vitaminen, nämlich

Biotin	0,01–10 mg/L	
D-Ca-Pantothenat	0,01–10 mg/L	
Cholinchlorid	0,1–50 mg/L	60
Folsäure	0,01–10 mg/L	
i-Inositol	0,1–100 mg/L	
Nicotinamid	0,01–10 mg/L	
Pyridoxal · HCL	0,01–10 mg/L	
Riboflavin	0,1–100 µg/L	65
Thiamin · HCL	0,1–50 mg/L	
Para-Aminobenzoessäure	1–1000 µg/L	

Vitamin B ₁₂	1–1000 µg/L
Niacin	1–100 µg/L
Ascorbinsäure	1–5000 µg/L
Folinsäure	1–100 µg/L
Liponsäure	1–100 µg/L
Vitamin A (Acetat)	10–1000 µg/L
Pyridoxin · HCl	1–100 µg/L
Niacinamid	1–100 µg/L
α-Tocopherolphosphat	0–1000 µg/L

sowie

D-Glucose	100–5000 mg/L
Phenolrot	0,1–1000 mg/L
Glutathion (reduziert)	0,01–10 mg/L
Na-Pyruvat	0,1–50 nM
Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor, EGF) -rekombinant	1–3000 ng/L
Fötales Rinderserum (FBS) Insulin vom Rind (Lyophilisat)	0,1–50 mg/L

und Antibiotika zusammengesetzt ist.

9. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, zur ortsaufgelösten Aufbereitung der Gewebeprobe, gekennzeichnet durch einen Schneidapparat zum sequentiell-parallelen Zerteilen der Gewebeprobe (6) in einzelne, voneinander getrennte Gewebesegmente (6a) und der entsprechenden Schnittstelle zugehöriger Gewebeflüssigkeit, bestehend aus einer in Kammern mit Unterkammern (1a1 bis 1a10, 1b1 bis 1b5, 1c1 bis 1c3, 1d und 1e1 bis 1e10) aufgeteilten Auffangschale (1), einer auf dieser lösbar gehaltenen Schneidplatte (2) mit zur Auffangschale (1) hin teilweise offenen Schneidrinnen (4) sowie einem Schneidmesserrahmen (3) für Schneidmesser (10), wobei die Anordnung der Schneidmesser (10) im Schneidmesserrahmen (3) mit der der Schneidrinnen (4) in der Schneidplatte (2) übereinstimmt und jeder Schneidrinne (4) eine sich unter dieser befindenden einzelnen Unterkammer zugeordnet ist; sowie ein Zerkleinerungsgerät zur weiteren Aufbereitung der ortsaufgelösten Gewebeprobensegmente (6a), die eine in Kammern (13a bis 13e) aufgeteilte Flüssigkeits-Auffangschale (13), eine auf dieser lösbar angebrachte Aufbereitungsplatte (15) mit Vertiefungen (16) sowie Drehstempel (18) mit Drehstempelmessern (19) umfaßt, wobei die Vertiefungen (16) Löcher (17) aufweisen und sich jeweils oberhalb einer Kammer (13a bis 13e) befinden und die Drehstempel (18) den Vertiefungen (16) zugeordnet sind.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidplatte (2) eine senkrecht zu den Schneidrinnen (4) verlaufende und mittig angeordnete aufgeraute Auflagefläche (5) zur stabilen Lagerung der Gewebeprobe (6) aufweist.

11. Vorrichtung nach Anspruch 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidrinnen (4) im Bereich der Auflagefläche (5) zu der darunterliegenden Unterkammer hin offen sind, so daß beim Schneiden gebildete Gewebeflüssigkeit oder Gewebestücke getrennt in der jeweiligen Unterkammer aufgefangen werden.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Breite der Schneidrinnen (4) größer als die Stärke der Schneidmesser (10) ist.

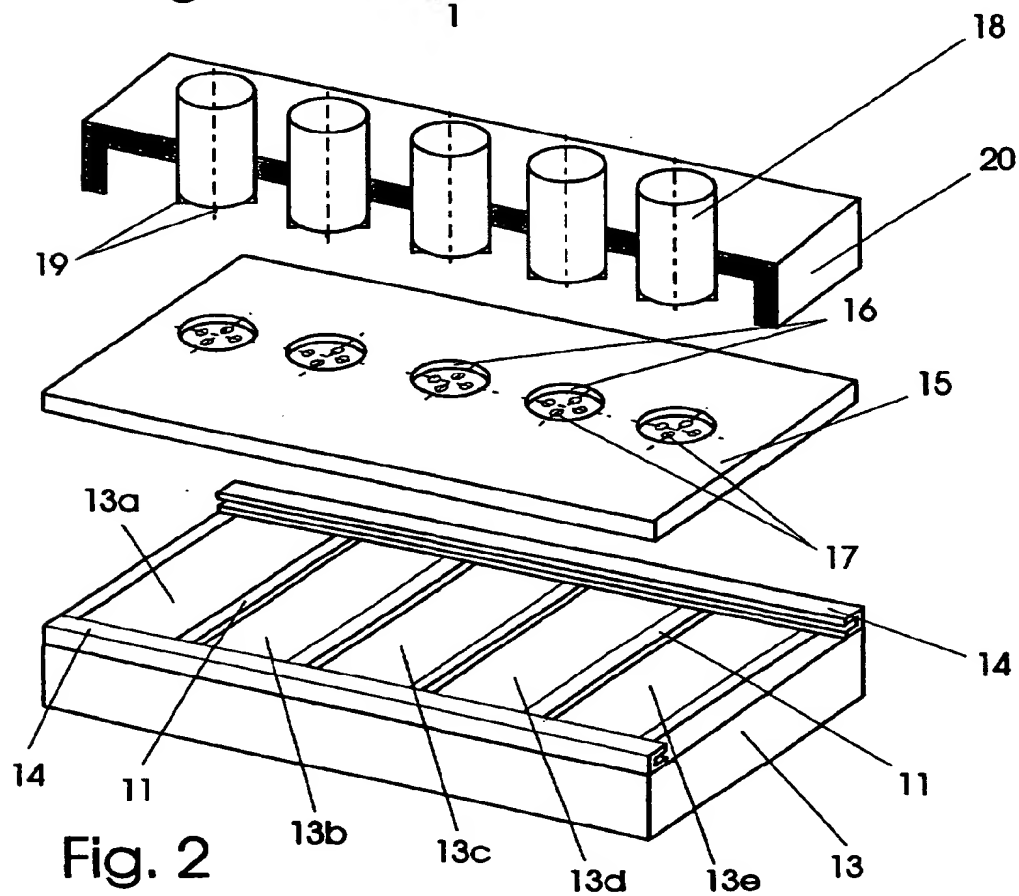
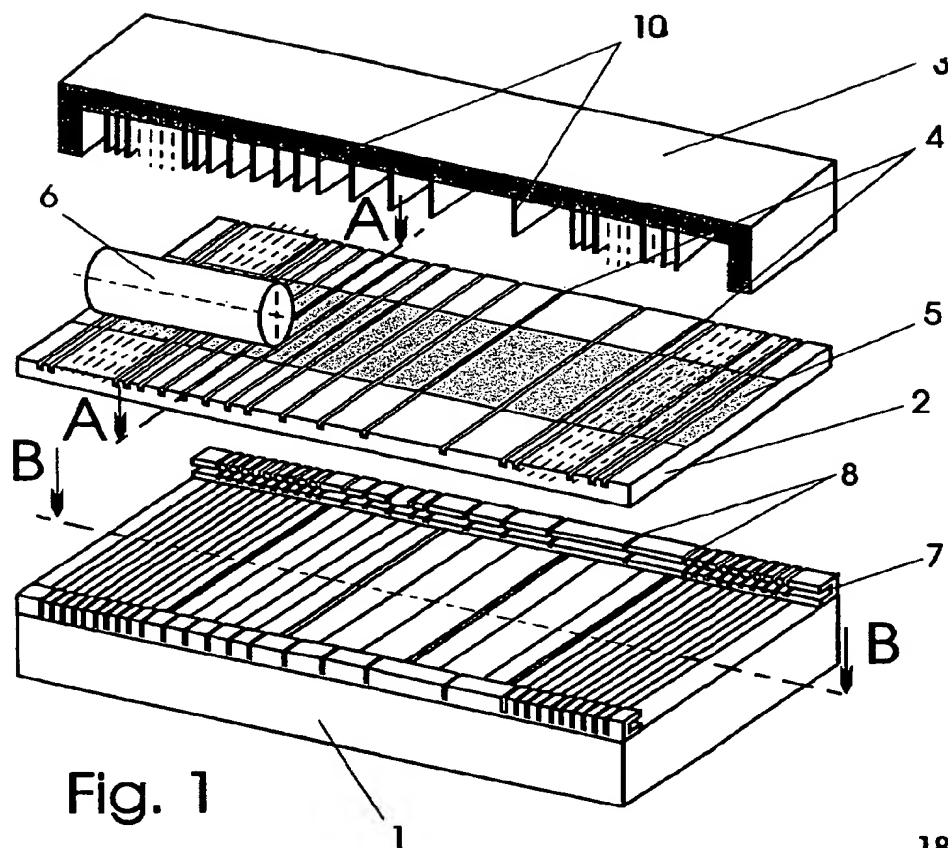
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidmesser (10) an einer Deckplatte des Schneidmesserrahmens (3) befestigt sind.

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidmesser (10) in dem Schneidmesserrahmen (3) gespannte Schneiddrähte bilden.

15. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidplatte (2) und die Aufbereitungsplatte (15) jeweils in Führungsschienen (7 bzw. 14) an der Auffangschale (1) bzw. der Flüssigkeits-Auffangschale (13) gehalten sind, wobei in den Führungsschienen (7) für die Schneidplatte (2) mit den Schneidrinnen (4) fluchtende Einschnitte (8) ausgebildet sind.

16. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Drehstempel (18) in Bohrungen einer Drehstempel-Halteplatte (20) in senkrechter Richtung bewegbar sowie drehbar angeordnet sind.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen



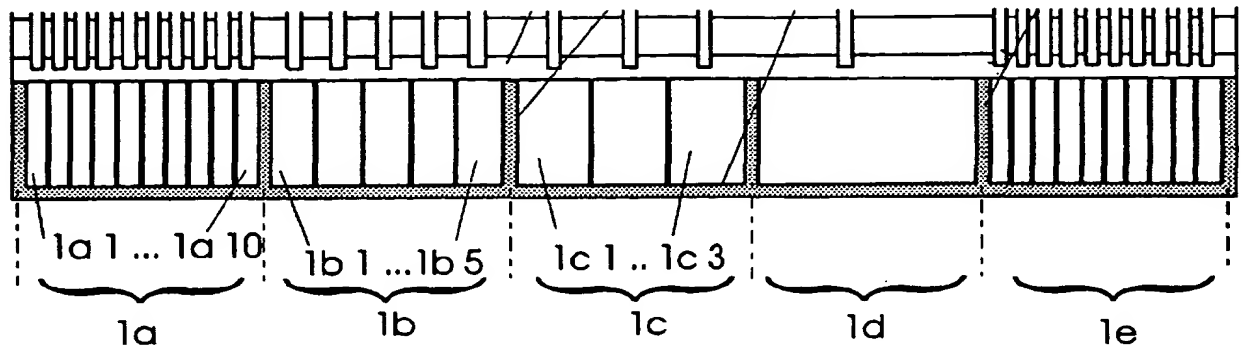


Fig. 3

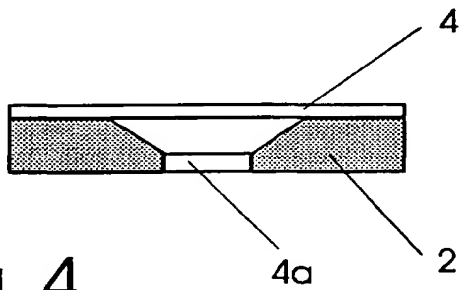


Fig. 4

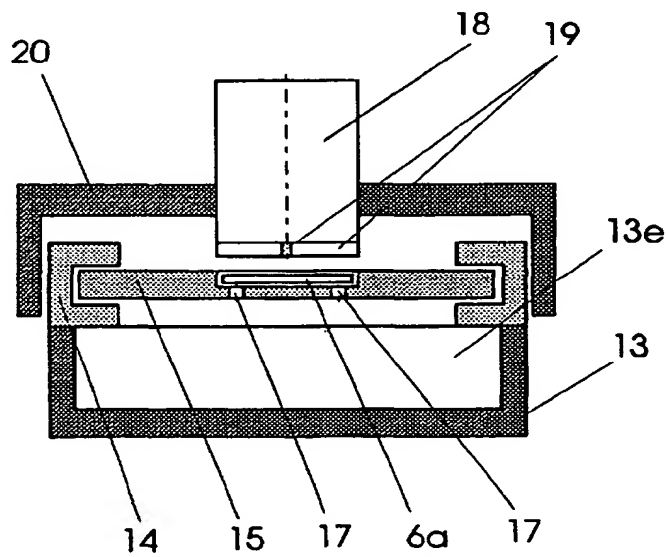


Fig. 5